

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Chemie v přírodních vědách



Michal Malý

**Srovnání citlivosti bezkontaktní vodivostní detekce a přímé UV
detekce při elektroforetickém stanovení N-acetylaminosacharidů**

Comparison of contactless conductivity detection and direct UV detection
sensitivity for electrophoretic determination of N-acetylaminosaccharides

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D

Praha 2014

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D za veškerou pomoc, čas a trpělivost, kterou mi při vypracovávání této bakalářské práce věnoval.

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu MSM0021620857 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a projektu 710 Grantové agentury Univerzity Karlovy.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 19. 6. 2014

Podpis

Abstrakt

Tato práce se zabývá vývojem a optimalizací metody separace N-acetylglukosaminu a jeho dimeru a trimeru kapilární zónovou elektroforézou s využitím bezkontaktní vodivostní detekce. Bylo zjištěno, že separace a detekce těchto látek je možná, pokud je jako pracovní elektrolyt použit hydroxid sodný, použití jiných elektrolytů jako hydrogenfosforečnanu sodného mělo za následek nepříjemně vysoký šum základní linie. Optimální podmínky pro provedení separace byly při koncentraci pracovního elektrolytu 40 mmol dm^{-3} a pracovním napětí 15 kV. Metoda je velmi citlivá na pH pracovního elektrolytu a použitý pracovní elektrolyt způsobuje rychlou degradaci kapiláry. Z těchto důvodů je obtížné spolehlivě provést kalibraci. Vyvinutá metoda byla porovnána s již existující metodou pro separaci těchto analytů využívající UV detekci. Existující metoda má v porovnání s vyvinutou metodou nižší meze detekce a stanovitelnosti a je méně citlivá na pracovní podmínky. Meze detekce a stanovitelnosti vyvinuté metody jsou $34 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$, respektive $104 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$, meze detekce a stanovitelnosti metody využívající UV detekci jsou $7 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$, respektive $21 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$. Uvedené meze stanovitelnosti jsou uvedeny pro analyt, pro který byla detekce nejméně citlivá, v obou případech šlo o dimer. Výhodou vyvinuté metody proti metodě existující je lepší separace dimeru a trimeru. Vzhledem k zjištěným výsledkům lze předpokládat, že by metodu bylo možné použít i pro separaci vyšších oligomerů.

Klíčová slova

Kapilární elektroforéza, sacharidy, bezkontaktní vodivostní detekce, N-acetylglukosamin

Abstract

This work deals with development and optimization of a method for separation and detection of N-acetylglucosamine and its dimer and trimer using capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection. Separation and detection of these substances is possible if sodium hydroxide is used as background electrolyte. Usage of another electrolyte such as disodium phosphate leads to unacceptable baseline noise level. Optimal conditions of this method are a background electrolyte concentration of 40 mmol dm^{-3} and voltage of 15 kV. The method is very sensitive to background electrolyte pH, used background electrolyte also causes rapid degradation of the inner capillary wall which is why this method has proven difficult to calibrate properly. The developed method was compared to an already existing method which uses UV detection. The existing method has lower limits of detection and quantification and is less sensitive to working conditions. Limits of detection and quantification of the developed method are $34 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ and $104 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ respectively. Limits of detection and quantification of the method based on UV detection are $7 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ and $21 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ respectively. Limits of quantification are that of the analyte whose detection was the least sensitive which was the dimer in both cases. An advantage of the developed method is better separation of dimer and trimer. Given the obtained results it can be safely assumed that this method could be used to separate higher oligomers as well.

Keywords

Capillary electrophoresis, saccharides, contactless conductivity detection, N-acetylglucosamine

Obsah

1	Teorie	7
1.1	Princip elektroforetické separace	7
1.2	Kapilární zónová elektroforéza	7
1.3	Instrumentace v kapilární zónové elektroforéze	9
1.4	Bezkontaktní vodivostní detekce	9
1.5	Chitin	11
1.6	Přímá detekce chitooligosacharidů	11
1.7	β -N-acetylhexosaminidáza	12
1.8	Současný stav poznání	12
2	Cíl práce	13
3	Experimentální část	14
3.1	Použité chemikálie	14
4	Výsledky a diskuse	15
4.1	Optimalizace koncentrace pracovního elektrolytu NaOH	15
4.2	Optimalizace pracovního napětí	17
4.3	Další faktory ovlivňující separaci	19
4.4	Kalibrace	19
4.5	Porovnání citlivosti CCD a UV detekce	21
4.6	Porovnání v 20 a 50 μm kapiláře	21
4.7	Porovnání v 75 μm kapiláře	21
5	Závěr	24
6	Použité zdroje	25

Použité zkratky

BGE	pracovní elektrolyt
CCD	bezkontaktní vodivostní detektor (bezkontaktní vodivostní detekce)
GlcNAc	N-acetylglukosamin
CZE	kapilární zónová elektroforéza
EOF	elektroosmotický tok
HV	vysoké napětí
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
SNR	poměr signál - šum
UV	ultrafialové

Použité symboly

c	molární koncentrace
C	kapacitance
E	intenzita elektrického pole
f	pracovní frekvence CCD detektoru
F	Faradayova konstanta
K	konstanta vodivostní cely
N	počet teoretických pater
Q	elektrický náboj
r	poloměr
R	rezistance
SD	směrodatná odchylka
Y	admitance
x_{bl}	průměrná hodnota signálu základní linie
t_{mig}	migrační čas
η	viskozitní koeficient
κ	specifická vodivost roztoku
μ_{eof}	elektroforetická pohyblivost elektroosmotického toku
μ_{ef}	efektivní pohyblivost
v_{eof}	rychlost elektroosmotického toku
ζ	hodnota zeta potenciálu

1 Teorie

1.1 Princip elektroforetické separace

Elektroforetické separace jsou založeny na migraci částic v elektrickém poli. Částice o daném poloměru a náboji je hnána gradientem elektrického pole mezi dvěma elektrodami k elektrodě s opačným nábojem, než má částice. Protože se částice pohybuje v kapalině s danou viskozitou η , je podle Stokesova zákona brzděna silou úměrnou koeficientu tření. Hnací síla působící na částici je přímo úměrná intenzitě elektrického pole E a náboji částice Q a nepřímo úměrná jejímu poloměru r . Třecí síla je přímo úměrná jejímu poloměru a rychlosti v . Tyto síly jsou v ustáleném stavu vyrovnány a platí tedy rovnice 1. Je tedy zřejmé, že částice se budou v elektrickém poli pohybovat tím rychleji, čím budou mít větší náboj a čím budou menší.

Rovnice 1: Rychlost elektroforetické migrace

η - viskozitní koeficient, E - intenzita elektrického pole, r - poloměr iontu, Q - elektrický náboj iontu [1]

$$v = \frac{Q}{6\pi\eta r} E$$

Ionty v roztoku jsou solvatovány (hydratovány) a solvatační obal je složitý, jeho struktura, velikost a tvar závisí na složení systému a experimentálních podmínkách. Ionty nejsou nikdy nezávislé, ale vzájemně se ovlivňují. Složitost reálné situace v roztocích elektrolytů má za následek, že elektroforetické chování nelze přesně teoreticky předvídat, na druhou stranu umožňuje široce modifikovat průběh separace vhodně zvolenými podmínkami a složením systému. Při elektroforetických separacích pracujeme v naprosté většině případů s velmi malými koncentracemi, takže chování systému není příliš vzdáleno ideálnímu modelu. Za těchto podmínek se ionty v roztoku málo vzájemně ovlivňují a předpokládáme, že platí Kohlrauschův zákon o neodvislé mobilitě iontů. Mobilitu jednotlivých iontů regulujeme úpravou hodnot náboje nebo navázáním iontů do vhodných komplexů.

1.2 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je separační metoda založená na elektroforetické migraci iontů v elektrickém poli. Je použitelná ke stanovení anorganických i organických látek, jejichž molekuly mohou nést v důsledku disociace či protonizace záporný či kladný náboj. CZE je vhodná k separaci a stanovení iontů lišících se hmotností, nábojem a tvarem. Ionty se dělí na základě jejich rozdílných elektroforetických pohyblivostí.

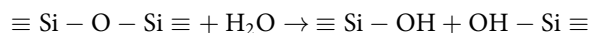
Ionty jsou v kapiláře unášeny tzv. *elektroosmotickým tokem* (EOF). Na rozhraní stěny kapiláry a roztoku se na základě elektrostatických zákonů systém orientuje tak, aby se k sobě maximálně přiblížily částice s opačným nábojem a dochází tak ke vzniku *elektrické dvojvrstvy*. Elektrická dvojvrstva má vlastnosti elektrického kondenzátoru a je charakterizována kapacitou a potenciálovým rozdílem mezi tenkými vrstvami v obou fázích přiléhajícími k rozhraní. V tuhé fázi je orientace částic neměnná, v kapalně fázi je konstantní pouze struktura iontů. Směrem dovnitř kapalně části orientace částic s klesající intenzitou elektrického pole dvojvrstvy postupně klesá a stále více se projevují difúzní a konvektivní děje. Potenciál mezi vnitřní a vnější hranicí difúzní vrstvy je tzv. *elektrokinetický* čili *zeta* (ζ) potenciál.

V křemenné kapiláře běžně používané v CZE se tento jev projeví následovně. Stěna křemenné kapiláry má na povrchu silanolové skupiny, které v závislosti na pH disociují. Při nepříliš nízkém pH je povrch kapiláry nabit záporně, v roztoku v kapiláře se tedy vytvoří Helmholtzova a difúzní vrstva. Je-li na kapiláru

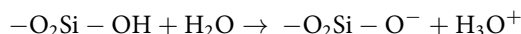
vloženo vnější napětí, začnou se ionty v difúzní vrstvě pohybovat směrem k elektrodě s opačným nábojem; ionty v Helmholtzově vrstvě jsou pevně vázány k povrchu kapiláry a nepohybují se. Protože ionty jsou v roztoku solvatovány, je prostřednictvím slovačnických obalů nucen k pohybu celý objem roztoku. Tento mechanický pohyb roztoku je nazýván *elektroosmotický tok*, jeho směr je určen polaritou nábojů ve dvojvrstvě, jeho rychlost je přímo úměrná zeta-potenciálu, intenzitě vloženého elektrického pole a relativní permitivitě a nepřímo úměrná viskozitě roztoku.

V CZE unáší elektroosmotický tok kladně i záporně nabitě ionty k detektoru a tyto ionty zároveň migrují svými rozdílnými elektroforetickými rychlostmi uvnitř roztoku, čímž se vzájemně dělí. Během jednoho experimentu je možné dělit oba druhy iontů. Metoda je vhodná pouze pro stanovení molekul s nábojem. Samotná analýza se provádí v křemenné kapiláře potažené vrstvou polyimidu. Její vnější průměr je 375 μm a vnitřní průměr zpravidla jednotky až desítky mikrometrů. Je-li kapilára naplněna vhodným elektrolytem, dochází k hydrolyze siloxanových skupin ($\equiv \text{Si} - \text{O} - \text{Si} \equiv$) za vzniku silanolových skupin ($\equiv \text{Si} - \text{OH}$) (rovnice 2) a následně k jejich disociaci dle rovnice 3.

Rovnice 2: Vznik silanolových skupin [1]



Rovnice 3: Disociace silanolových skupin [1]



$$\text{pK}_a = 5,5$$

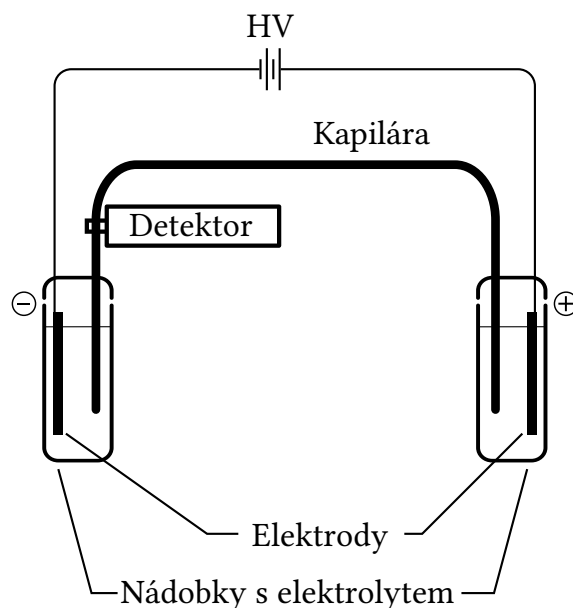
Uvolní se protony obalené molekulami vody vytvářejí v kapiláře EOF a putují směrem ke katodě. Rychlost tohoto EOF je přímo úměrná intenzitě elektrického pole E a elektroosmotické mobilitě μ_{eof} , která charakterizuje podmínky v kapiláře - velikost záporného náboje na její stěně a iontovou sílu roztoku - platí tedy rovnice 4. Na rychlost EOF má kromě pH separačního elektrolytu vliv i jeho koncentrace. Vyšší koncentrace separačního elektrolytu snižuje ζ -potenciál elektrické dvojvrstvy, která vede k nižší elektroosmotické mobilitě.

Rovnice 4: Rychlost elektroosmotického toku

v_{eof} - rychlost migrace EOF, μ_{eof} - elektroforetická pohyblivost EOF, E - intenzita elektrického pole [1]

$$v_{eof} = \mu_{eof} \cdot E$$

Profil lokálních rychlostí je v kapalině tekoucí působením elektroosmózy poměrně plochý, což vede k malému rozmývání zón. Tento rychlostní profil je částečně deformován tepelnými efekty uvnitř kapiláry způsobenými elektrickým proudem procházejícím roztokem. Elektrický výkon daný součinem proudu procházejícího kapilárou a napětím vloženým na elektrody se mění na *Jouleovo teplo*, které je vedeno stěnou kapiláry do okolí. Čím vodivější roztok a větší průměr kapiláry je použit, tím více tepla je generováno. Jouleovo teplo ohřívá elektrolyt a deformuje rovný rychlostní profil na profil mírně parabolický, což vede k většímu rozmývání zón. Jouleovo teplo přispívá k rozmývání i tím, že BGE o vyšší teplotě má nižší viskozitu.



Obrázek 1: Schéma běžné CZE aparatury

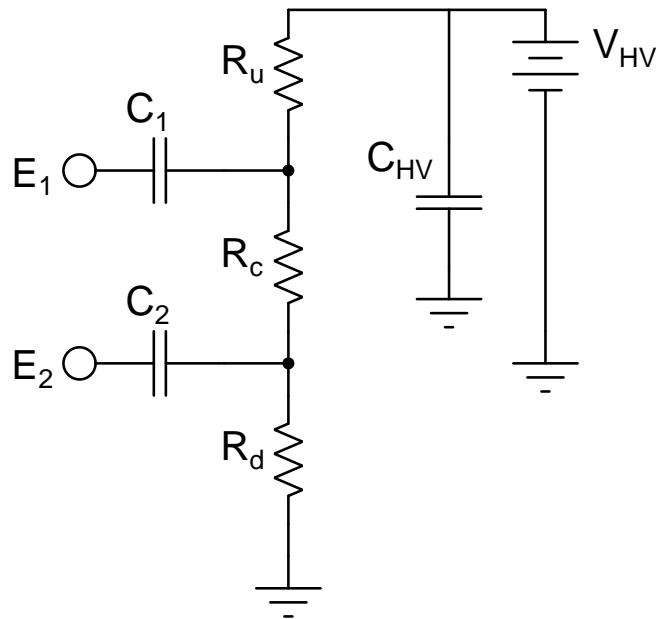
1.3 Instrumentace v kapilární zónové elektroforéze

Běžné uspořádání při kapilární zónové elektroforéze je znázorněno na obrázku 1. Oba konce kapiláry jsou ponořeny do nádoby s pracovním pufrům. Na nádoby je pomocí elektrod vloženo vysoké napětí ze stabilizovaného zdroje, běžně se pro separace v CZE používají napětí v řádech kilovoltů; při provedení HV-CZE až 60 kV. Použití vysokého napětí je provázáno problémy způsobenými přílišným zahříváním kapiláry Jouleovým teplem. Proud procházející kapilárou během měření se pohybuje v řádu desítek mikroampér. Vzorek je do kapiláry dávkován *elektrokineticky* nebo *hydrodynamicky*. Při elektrokinetickém dávkování se vstupní konec kapiláry ponoří do nádoby se vzorkem a na kapiláru se vloží napětí. Elektrokinetické dávkování ze své podstaty upřednostňuje ty složky vzorku, které mají ve vzorku elektrický náboj; podle polarit vloženo napětí buď kationty nebo anionty. Této skutečnosti je možné využít pro zakoncentrování studovaného analytu již při dávkování. Hydrodynamické dávkování využívá pro vpravení vzorku do kapiláry rozdíl tlaků na vstupu a výstupu kapiláry. Tohoto rozdílu se v praxi dosahuje buď výškovým rozdílem nádoby se vzorkem a nádoby výstupní nebo vytvořením přetlaku nad hladinou v nádobce se vzorkem. Hydrodynamické dávkování je vhodné použít v případech, kdy je nutné zachovat složení vzorku.

Nejběžnějším typem detekce v CZE je spektrofotometrická detekce v UV a VIS oblasti. Detektor je umístěn několik centimetrů od výstupního konce kapiláry, ze které byl v místě s detektorem odstraněn polyimidový obal. Dalšími běžně používanými typy detektorů jsou detektory vodivostní, voltametrické, ampérometrické nebo hmotnostně spektrometrické. Spektrofotometrická detekce je upřednostňována, protože ji lze využít k detekci libovolných látek, které absorbují elektromagnetické záření v UV či VIS oblasti, závislost odezvy detektoru na koncentraci analytu je lineární a měření jsou dobře reprodukovatelná.

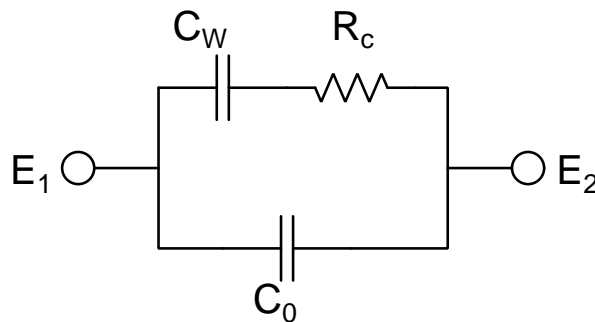
1.4 Bezkontaktní vodivostní detekce

Bezkontaktní vodivostní detektor typu C⁴D (*Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector*) byl navržen v roce 1998 nezávisle dvěma výzkumnými skupinami, skupinou Zemanna [2] a skupinou Fracassi da Silvy a do Laga [3]. Bezkontaktní vodivostní detektor se skládá ze dvou elektrod ve tvaru krátkých kovových trubiček obklopujících kapiláru, které jsou od sebe vzdáleny 0,1 - 0,5 cm. Elektrody jsou od sebe odděleny



Obrázek 2: Běžný C^4D detektor

R_d - odpor roztoku před detekční celou, R_c - odpor roztoku v detekční cele, R_u - odpor roztoku za detekční celou, C_1, C_2 - kapacity elektrod, C_{HV} - kapacita zdroje VN



Obrázek 3: Obvod detekční cely

R_c - Odpor roztoku v detekční cele, C_W - kapacity stěn kapiláry, C_0 - celková parazitní kapacita mezi elektrodami

kovovým plátkem, který funguje jako Faradayův izolant; signál mezi elektrodami tedy může procházet jen skrz analyzovaný roztok. Na první elektrodu je přiveden elektrický signál o vysoké frekvenci, řádově stovky kilohertzů a více. Signál prochází roztokem ke druhé elektrodě, kde je zaznamenáván. Signál na druhé elektrodě je přímo úměrný admitanci cely, která je funkcí vodivosti roztoku mezi elektrodami. Toto uspořádání umožňuje měřit rozdíl vodivosti čistého separačního elektrolytu a elektrolytu, který obsahuje další látky (ΔG). Tento rozdíl lze popsat rovnicí 5. Obecně platí, že čím je vyšší frekvence aplikovaného signálu, tím je odezva detektoru lineárnější. Významný podíl na citlivosti a linearitě odezvy detektoru má parazitní kapacita, která je důsledkem přímé interakce obou elektrod, a kapacita stěn kapiláry. Schéma C^4D detektoru je znázorněno na obrázku 2. Nejjednodušší elektrický obvod znázorňující C^4D detekční celou je na obrázku 3.

Absolutní hodnotu admitance detekční cely znázorněnou obvodem na obrázku 3 lze popsat rovnicí 6.

Hodnota kapacity stěn kapiláry C_W je ve všech případech vypočtena ze vztahu $(C_1 \cdot C_2)/(C_1 + C_2)$, kde C_1 je kapacita první elektrody a C_2 kapacity druhé elektrody.

Rovnice 5: Změna vodivosti roztoku způsobená přítomností analytů

c_A - koncentrace analytu, μ_A - absolutní mobilita analytu, μ_S - absolutní mobilita koiontu, μ_O - absolutní mobilita protiiontu, F - Faradayova konstanta, K - konstanta cely [4]

$$\Delta G = c_A \frac{(\mu_A - \mu_S)(\mu_A + \mu_O)}{\mu_A} \cdot \frac{F}{10^{-3}K}$$

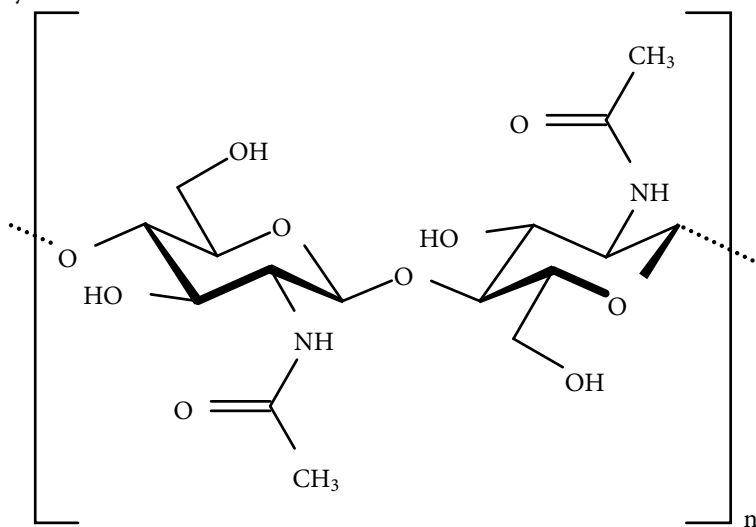
Rovnice 6: Absolutní hodnota admitance měřící cely

K - konstanta cely, κ - specifická vodivost roztoku v cele, C_W - kapacitance stěn kapiláry, f - pracovní frekvence [4]

$$|Y| = \frac{1}{\sqrt{\left(\frac{K}{\kappa}\right)^2 + \frac{1}{4\pi^2 f^2 C_W^2}}}$$

1.5 Chitin

Chitin je běžný polysacharid složený z N-acetylglukosaminových monomerních jednotek, které jsou spojené β -(1 \rightarrow 4) vazbou. Chitin tvoří důležitou složku buněčné stěny hub, přestože jeho celkový obsah v buněčné stěně je zhruba 1 %. Dále tvoří exoskeleton hlavonožců a koryšů. Jeho struktura je srovnatelná se strukturou celulózy.



Obrázek 4: Struktura chitinu [5]

1.6 Přímá detekce chitoooligosacharidů

V kapilární elektroforéze je možné k detekci chitoooligosacharidů použít bezkontaktní vodivostní detekci. V dostatečně zásaditém prostředí jsou tyto sacharidy ve formě aniontu z důvodu disociace hydroxylových skupin. Anionty chitoooligosacharidů tedy budou migrovat proti směru elektroosmotického toku. Bezkontaktní vodivostní detekce sacharidů je možná, protože anionty chitoooligosacharidů mají nižší mobilitu než hydroxylové anionty a sodné kationty, které tvoří pracovní elektrolyt. Z teorie bezkontaktní vodivostní detekce vyplývá, že zóna obsahující chitoooligosacharidy se projeví poklesem signálu CCD detektoru. Sacharidy není před stanovením potřeba nijak derivatizovat.

1.7 β -N-acetylhexosaminidáza

Houbové β -N-acetylhexosaminidázy jsou enzymy, které katalyzují hydrolyzu chitobiózy na její stavební sacharidy. Tyto enzymy jsou v průběhu života houby fyziologicky významné. Jsou známy krystalové struktury dvou monomerních bakteriálních enzymů a dimerní lidské lysozomální β -N-acetylhexosaminidázy. Houbové β -N-acetylhexosaminidázy jsou robustní enzymy běžně používané v chemoenzymové syntéze oligosacharidů. Lidská β -N-acetylhexosaminidáza je zajímavá z důvodu allelových variací *HexA* a *HexB*, způsobujících vrozené defekty známé jako Sandhoffova či Tay-Sachsova choroba.

1.8 Současný stav poznání

Bezkontaktní vodivostní detekce se v kapilární zónové elektroforéze používá k detekci malých sacharidů, např. pro stanovení sacharidů v energetických či ovocných nápojích a dalších různých potravinách. Existují i metody pro stanovení N-acetylglukosaminu a jeho oligomerů využívající UV [6] i bezkontaktní vodivostní detekci.

Metoda pro stanovení sacharidů v energetických nápojích [7] využívá kapiláru o vnitřním průměru 10 μm a efektivní délce 4 cm. Separace probíhala při napětí 5 kV, jako separační elektrolyt byl použit 75mmol dm^{-3} NaOH. Metoda umožňuje rychle (migrační časy 30 až 60 s) separovat mono a disacharidy v energetických nápojích s mezí detekce až 44 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ (pro sacharózu).

Metoda pro stanovení v různých potravinách (jogurty, ovocné nápoje, víno, ...) [8] využívá křemennou kapiláru o průměru 5 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ a efektivní délce 18,3 cm. Separace probíhala v 75mmol dm^{-3} NaOH při napětí 15 kV. Metoda umožňuje separovat mono a disacharidy v testovaných potravinách s mezí detekce 0,40 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ pro laktózu. Doba analýzy je kratší než 2 min.

Metoda stanovující mono a disacharidy v ovocných nápojích [9] využívá kapiláru a vnitřním průměru 20 μm o efektivní délce 35,5 cm. Jako pracovní pufr je použit roztok o složení 10mmol dm^{-3} NaOH, 4,5mmol dm^{-3} Na_2HPO_4 a 200mmol dm^{-3} CTAB, separační napětí bylo 25 kV. Metoda umožňuje separovat mono a disacharidy s limity detekce zhruba 15 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, doba analýzy je 2,5 min.

Metoda pro separaci N-acetylglukosaminu a jeho C2 - C6 oligomerů [10] využívá kapiláru o vnitřním průměru 50 μm a efektivní délce 62,5 cm. Jako pracovní pufr je použit roztok 10mmol dm^{-3} NaOH, 4,5mmol dm^{-3} Na_2HPO_4 v 10% v/v acetonitrilu. Vzorky byly připraveny v 100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ citrátovém pufru o pH 5, separace probíhala při napětí 15 kV. Metodou bylo možné separovat všech šest analytů, mez detekce byla pro všechny analyty 3 $\mu\text{mol dm}^{-3}$.

Další možnosti stanovení malých sacharidů kapilární zónovou elektrolýzou zahrnují prederivatizaci analytů p-aminobenzoovou kyselinou a následnou UV detekci [11], přímou UV detekci [12] či UV detekci při 270 nm využívající oxidační reakci analytů probíhající přímo v kapiláře, při které vznikají detekovatelné produkty [13].

Chitoooligosacharidy je možné stanovit nepřímou UV detekci proti vhodnému pozadí v pozitivně pokryté kapiláře [14] nebo jejich prederivatizací p-aminobenzonitrilem, 2-aminopyridinem nebo o-aminobenzoovou kyselinou [15].

2 Cíl práce

Cílem práce bylo optimalizovat podmínky separace N-acetylglukosaminu a jeho dimeru a trimeru v kapilární zónové elektroforéze při použití bezkontaktní vodivostní detekce a porovnat bezkontaktní vodivostní detekci s UV detekcí.

3 Experimentální část

Měření, kdy byla použita bezkontaktní vodivostní detekce, byla provedena v křemenné kapiláře o průměrech 50 μm (Caco, Slovensko) a 20 μm (Polymicro, Illinois, USA). Celková délka kapiláry byla 50 cm, efektivní délka byla 38,5 cm. Jako pracovní elektrolyt byl použit hydrogenfosforečnan sodný a hydroxid sodný. Kapilára byla termostatována na 25 °C. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky tlakem 55 mbar po dobu 8 s. Před každým měřením byla kapilára proplachována po dobu 2×210 s roztokem BGE, nejprve ze vstupní vialky do odpadní vialky a následně ze vstupní vialky do výstupní vialky. Koncentrace pracovního elektrolytu a napětí byly optimalizovány. Všechna měření probíhala na přístroji *Agilent Technologies CE 7100* (Waldbronn, Německo). Pro měření a úpravu pH byl použit pH-metr Jenway 3540 (Bibby Scientific Ltd., Velká Británie).

Pro porovnání bezkontaktní vodivostní a UV detekce analytů byly použity kapiláry a průměrech 20 (Polymicro, Illinois, USA), 50 a 75 μm (Caco, Slovensko). Při použití kapiláry o průměru 20 μm byly parametry metody stejné jako optimální parametry pro CCD detekci. S 50 μm kapilárou byl použit jako pracovní elektrolyt tetraboritan sodný o koncentraci 25 mmol dm^{-3} . Při použití 75 μm kapiláry byla její celková délka 65 cm a efektivní délka k UV detektoru 56,5 cm. Pracovním pufrům byl tetraboritan sodný o koncentraci 25 mmol dm^{-3} s pH upraveným na 10,0 - 10,5.

3.1 Použité chemikálie

Pevný hydroxid sodný p.a. (Penta, Česká Republika), kyselina citronová p.a. (Lach-ner, Česká Republika), hydrogenfosforečnan sodný p.a. (Lachema, Česká Republika) a N-acetyl-D-glukosamin, > 99%, N,N'-diacetylchitobiosa, > 96%, N,N',N''-triacetylchitotriosa, > 95% (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) z nichž byly připraveny analyzované vzorky.

4 Výsledky a diskuse

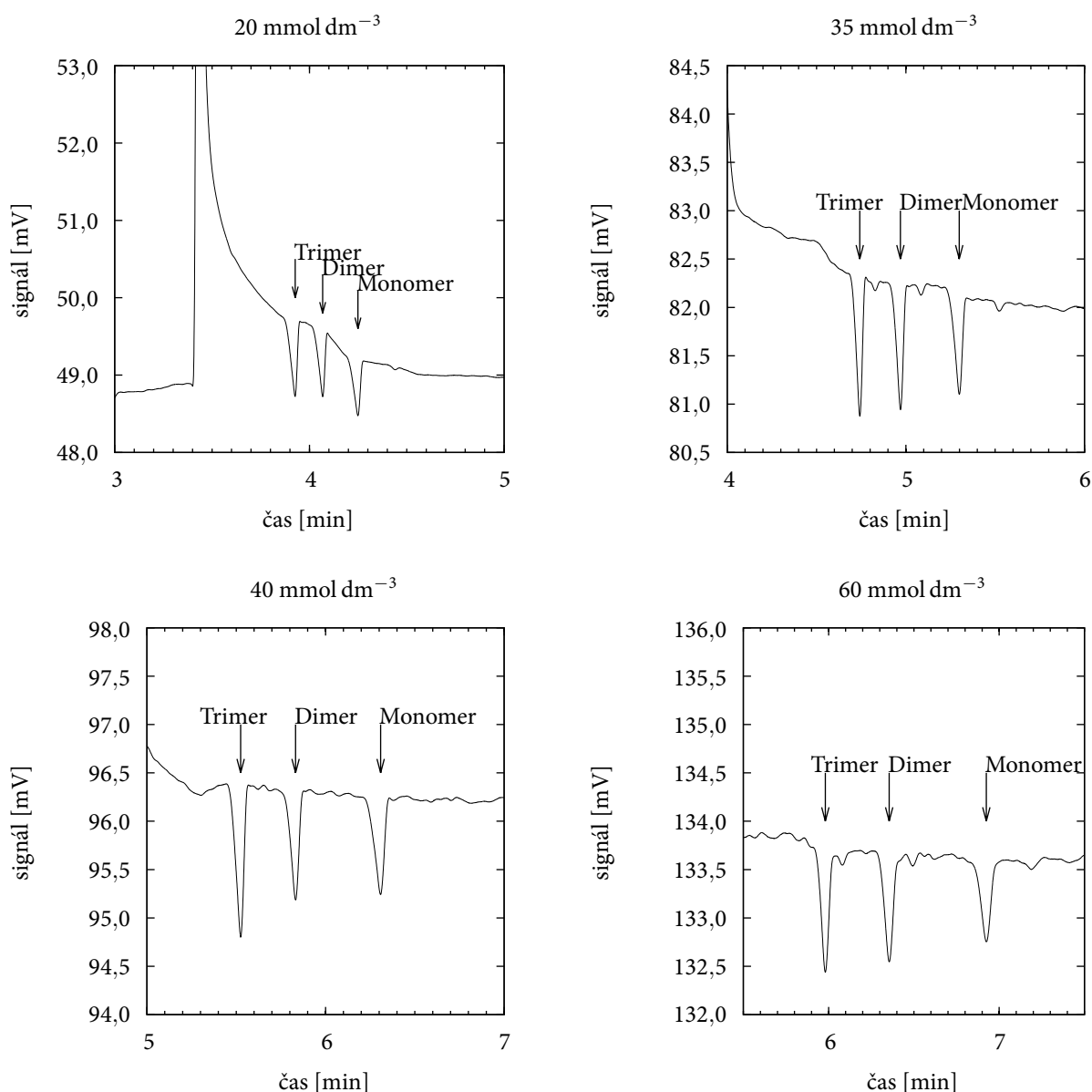
4.1 Optimalizace koncentrace pracovního elektrolytu NaOH

Optimalizace napětí a koncentrace pracovního elektrolytu byla provedena v kapiláře o průměru 20 μm , jako BGE byl použit vodný roztok hydroxidu sodného. Použití hydrogenfosforečnanu jako BGE se ukázalo jako nevhodné kvůli vysoké úrovni šumu základní linie. Z literatury bylo zjištěno, že separace a detekce malých sacharidů bezkontaktní vodivostní detekcí je možná při použití tenké kapiláry a vodného roztoku NaOH. V rámci práce bylo ověřeno, že separace a detekce studovaných analytů je v tomto experimentálním uspořádání možná a tato metoda byla optimalizována.

Tabulka 1: Vliv koncentrace BGE na migrační čas analytů a počet teoretických pater

t_{mig} - migrační čas, $SD\ t_{mig}$ - směrodatná odchylka migračního času, μ_{ef} - efektivní pohyblivost, $SD\ \mu_{ef}$ - směrodatná odchylka efektivní pohyblivosti, N - počet teoretických pater, $SD\ N$ - směrodatná odchylka počtu teoretických pater

	t_{mig} [s]	$SD\ t_{mig}$ [s]	μ_{ef} [$\frac{\text{cm}^2}{\text{V}\cdot\text{s}}$]	$SD\ \mu_{ef}$ [$\frac{\text{cm}^2}{\text{V}\cdot\text{s}}$]	N	$SD\ N$
20 mmol dm^{-3}						
EOF	208	2	-	-	-	-
Monomer	259	4	$1,20 \cdot 10^{-4}$	$5,36 \cdot 10^{-6}$	71 000	2000
Dimer	247	4	$9,72 \cdot 10^{-5}$	$5,16 \cdot 10^{-6}$	81 000	5900
Trimer	239	2	$8,04 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-7}$	78 000	4100
35 mmol dm^{-3}						
EOF	237	1	-	-	-	-
Monomer	316	3	$1,37 \cdot 10^{-4}$	$2,80 \cdot 10^{-6}$	90 000	1200
Dimer	297	2	$1,10 \cdot 10^{-4}$	$2,76 \cdot 10^{-6}$	86 000	3400
Trimer	283	2	$8,93 \cdot 10^{-5}$	$2,4 \cdot 10^{-6}$	79 900	1200
40 mmol dm^{-3}						
EOF	237	8	-	-	-	-
Monomer	392	19	$1,42 \cdot 10^{-4}$	$1,01 \cdot 10^{-6}$	72 000	6000
Dimer	361	16	$1,15 \cdot 10^{-4}$	$1,15 \cdot 10^{-6}$	88 000	100
Trimer	342	10	$9,48 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-7}$	64 000	1400
60 mmol dm^{-3}						
EOF	286	2	-	-	-	-
Monomer	477	4	$1,45 \cdot 10^{-4}$	$1,91 \cdot 10^{-7}$	85 000	3700
Dimer	387	5	$1,17 \cdot 10^{-4}$	$2,78 \cdot 10^{-7}$	81 000	1700
Trimer	363	4	$9,61 \cdot 10^{-5}$	$6 \cdot 10^{-7}$	68 000	7200



Obrázek 5: Elektroferogramy všech měřených koncentrací BGE ($U = 15 \text{ kV}$, $c_{\text{analyt}} = 500 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$)

Při optimalizaci koncentrace pracovního elektrolytu (BGE) byly pozorovány následující trendy (viz tabulka 1, obrázek 5). Úroveň signálu základní linie stoupala s rostoucí koncentrací BGE, což je způsobeno tím, že koncentrovanější roztok BGE má vyšší vodivost. Se stoupající vodivostí BGE rostla i úroveň šumu základní linie. S vyšší koncentrací klesala rychlost elektroosmotického toku, což prodlužovalo dobu potřebnou k analýze. Při příliš nízké koncentraci BGE byly $-\text{OH}$ skupiny analytů méně disociované, analyty méně nabitě, jejich elektroforetická pohyblivost byla nižší a signály analytů se objevovaly v oblasti, kde byl signál základní linie značně ovlivněn systémovým píkem EOF. Doba, po kterou se základní linie signálu ustalovala po průchodu systémového píku elektroosmotického toku byla při nižších koncentracích BGE delší. Na základě naměřených dat byl jako nejvhodnější zvolen roztok NaOH o koncentraci 40 mmol dm^{-3} . Při této koncentraci byla úroveň šumu základní linie přijatelná, analyty byly dostatečně separované a jejich signály se nacházely v oblasti, kde byla základní linie signálu rovná. Z počtu teoretických pater a směrodatných

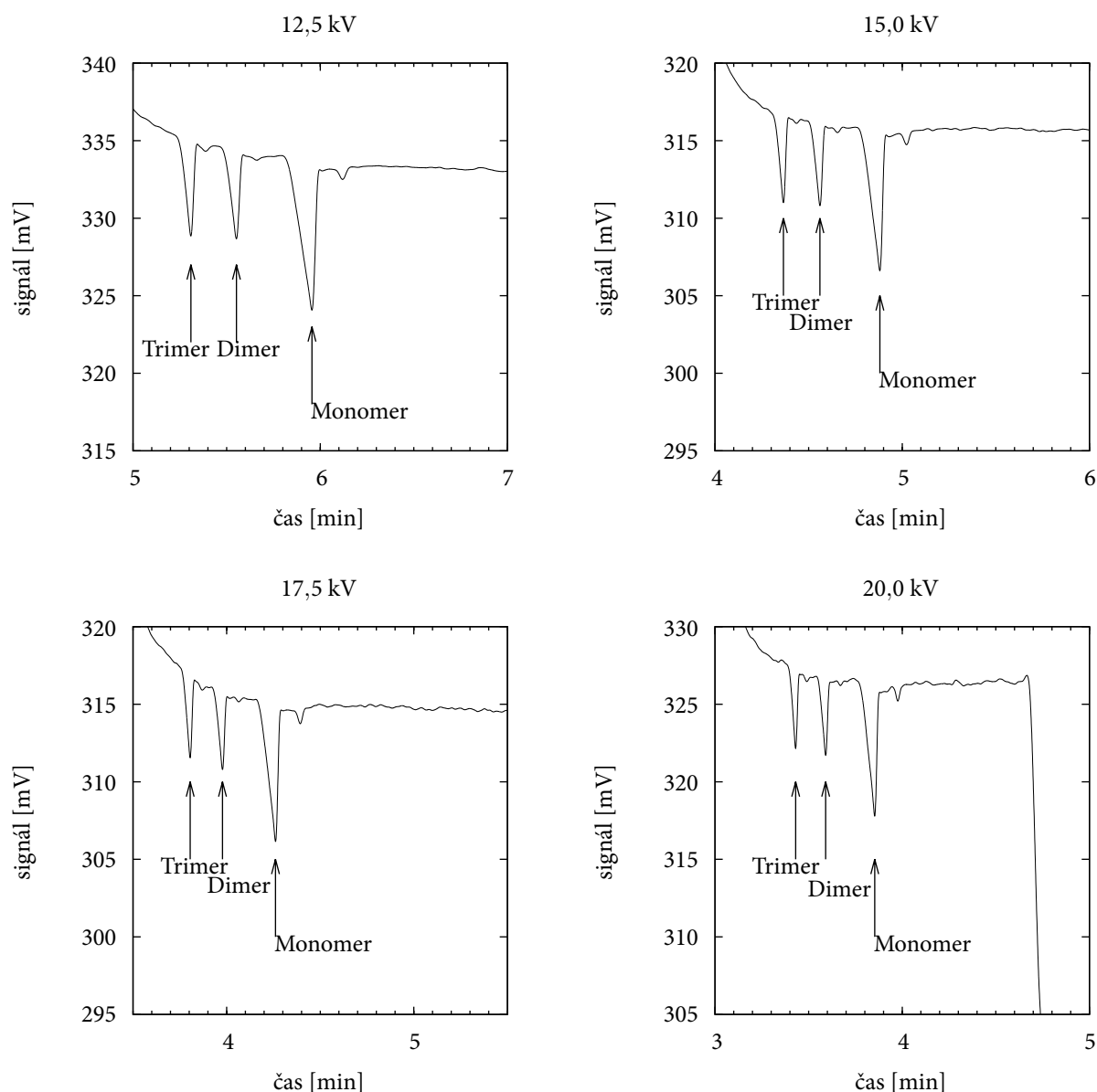
odchylek jejich hodnot vyplývá, že koncentrace BGE nemá na výšku teoretického patra jednoznačný vliv.

4.2 Optimalizace pracovního napětí

Po nalezení optimální koncentrace BGE bylo optimalizováno separační napětí. S rostoucím napětím se zrychluje elektroosmotický tok, což snižuje celkovou dobu nutnou pro provedení měření. To na druhou stranu zhoršuje separaci analytů, protože ty nemají čas se v roztoku oddělit. Cílem optimalizace napětí bylo nalézt nejvyšší možné napětí, při kterém jsou signály analytů v oblasti rovné základní linie. Optimalizace byla provedena pro napětí v rozsahu od 12,5 do 20,0 kV po kroku 2,5 kV.

Tabulka 2: Vliv separačního napětí na migrační čas analytů a počet teoretických pater
 t_{mig} - migrační čas, $SD\ t_{mig}$ - směrodatná odchylka migračního času, N - počet teoretických pater, $SD\ N$ - směrodatná odchylka počtu teoretických pater

	t_{mig} [s]	$SD\ t_{mig}$ [s]	N	$SD\ N$
12,5 kV				
EOF	267	2	-	-
Monomer	352	5	31 000	610
Dimer	327	3	85 000	3100
Trimer	316	3	85 000	2200
15,0 kV				
EOF	224	2	-	-
Monomer	297	3	34 000	1600
Dimer	277	3	88 000	6700
Trimer	266	3	92 000	6400
17,5 kV				
EOF	194	2	-	-
Monomer	248	12	37 000	3100
Dimer	234	8	91 000	4300
Trimer	230	2	103 000	10 000
20,0 kV				
EOF	173	1	-	-
Monomer	227	3	41 000	4700
Dimer	212	3	98 000	7700
Trimer	203	2	110 000	7100



Obrázek 6: Elektroferogramy pro zkoušená separační napětí ($c_{BGE} = 40 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{analyt} = 500 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$)

Rychlost elektroosmotického toku se zvyšujícím se napětím stoupala podle teoretického předpokladu, výsledky měření jsou uvedeny výše (viz tabulka 2 a obrázek 6). Jako optimální napětí bylo zvoleno 15 kV. Při tomto napětí bylo pro provedení analýzy potřeba necelých 5 minut a signály všech analytů se nacházely v oblasti, kde byla základní linie rovná. Zvýšení napětí až na 20 kV by zkrátilo analýzu na 4 minuty, ale signály analytů by se posunuly do oblasti, kde základní linie klesá vlivem systémového píku elektroosmotického toku. Protože účinnost separace je ovlivněna dalšími faktory diskutovanými níže, bylo pro zvýšení opakovatelnosti použito napětí pouze 15 kV, při kterém jsou píky analytů separovány s dostatečnou rezervou. S rostoucí hodnotou napětí také rostla úroveň šumu základní linie. Hodnoty počtu teoretických pater vykazovaly mírně vzestupný trend pro všechny studované analyty, nicméně výše popsané negativní vlivy vyššího napětí nad touto příznivou skutečností převažovaly.

4.3 Další faktory ovlivňující separaci

Při opakovaných měřeních bylo pozorováno postupné prodlužování migračních časů analytů i elektroosmotického toku. Tento jev byl provázen výkyvy úrovně signálu základní linie v oblasti za systémovým signálem elektroosmotického toku. Tuto degradaci bylo možné částečně odstranit krátkým propláchnutím kapiláry 1 mmol dm⁻³ roztokem NaOH, nicméně po provedení řádově několika desítek měření bylo nutné kapiláru nahradit novou. Rychlá degradace kapiláry je nejspíše způsobena použitím pracovního elektrolytu o vysokém pH, který postupně narušuje stěnu kapiláry.

Další podstatný vliv na funkčnost metody mělo pH použitého roztoku NaOH. Roztok NaOH byl skladován ve formě 75 mmol dm⁻³ roztoku, ze kterého byl potřebný 40 mmol dm⁻³ roztok připraven ředěním přímo ve vialce vkládané do stroje. Protože NaOH absorbuje ve vzduchu CO₂, který se v něm rozpouští za vzniku uhličitánových solí, pH zásobního roztoku postupně klesá. Při sledování trendu poklesu pH zásobního roztoku NaOH bylo vypořádováno následující:

Tabulka 3: Pokles pH zásobního roztoku NaOH

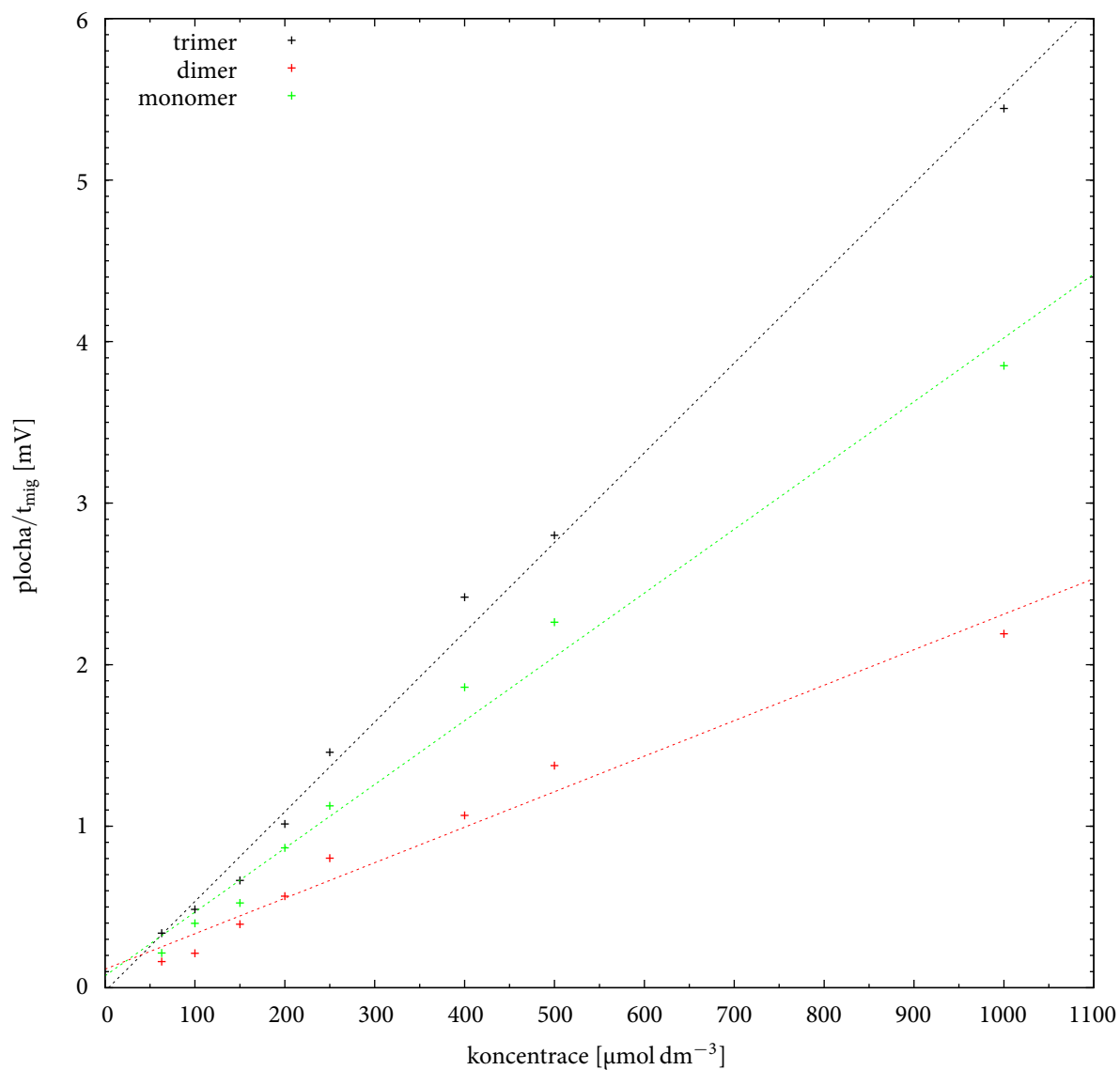
Stáří roztoku	pH
čerstvý	12,39
7 dní	12,35
14 dní	12,25

Pro stanovení pH roztoku byl použit vždy stejný pH metr. S klesající hodnotou pH se analyty dostatečně neseperoaly a jejich signály se přibližovaly systémovému píku elektroosmotického toku. Při poklesu pH o zhruba 0,15 jednotky již nebylo možné separaci provést.

4.4 Kalibrace

Za optimálních podmínek byla změřena kalibrační křivka. Koncentrace analytů ve vzorcích použitých pro kalibraci byly 1000 μmol dm⁻³, 500 μmol dm⁻³, 400 μmol dm⁻³, 250 μmol dm⁻³, 200 μmol dm⁻³, 150 μmol dm⁻³, 100 μmol dm⁻³ a 63 μmol dm⁻³. Každá koncentrace byla měřena třikrát.

Kvůli nestabilním podmínkám měření bylo velmi problematické získat dostatečně reprezentativní údaje, ze kterých by bylo možné sestavit kalibrační křivku. Tento zásadní nedostatek se bohužel nepodařilo odstranit.



Obrázek 7: Kalibrační křivka (Rozsah kalibrace 63 - 1000 $\mu\text{mol dm}^{-3}$)

Tabulka 4: Parametry kalibračních křivek
 k - směrnice, q - svislý posun, r - korelační koeficient

	k [$\text{mV } \mu\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3$]	q [mV]	r
Trimer	0,005 56	0,021 55	0,9977
Dimer	0,002 20	0,114 70	0,9861
Monomer	0,003 95	0,073 34	0,9924

4.5 Porovnání citlivosti CCD a UV detekce

Analyty je možné detekovat i spektrofotometricky při vlnové délce 210 nm kvůli přítomnosti amidové vazby. Cílem následující série měření bylo porovnat citlivost spektrofotometrické a bezkontaktní vodivostní detekce za podmínek optimálních pro obě metody.

4.6 Porovnání v 20 a 50 μm kapiláře

V prvním měření byl použit vzorek obsahující GlcNAc a jeho dimer a trimer o koncentraci $500\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$; matrici vzorku tvořil 19 mmol dm^{-3} roztok NaOH. Při prvním měření byl signál CCD detektoru v pořádku, na UV detektoru nebyly signály analytu pozorovány i přesto, že doba analýzy byla adekvátně prodloužena.

Dále byla provedena série měření s analyty o koncentraci 5 mmol dm^{-3} , $2,5\text{ mmol dm}^{-3}$ a 1 mmol dm^{-3} . I při tomto měření nebyly signály analytů v UV detektoru patrné.

Cílem této série měření bylo porovnat citlivost CCD a UV detektoru za podmínek co nejpodobnějších metodě, která byla optimalizována v předchozí části práce. UV detektor v tomto uspořádání není možné použít kvůli krátké optické dráze. Aby bylo možné skutečně porovnat citlivost CCD a UV detektoru, byla provedena další měření.

Dále byla použita 50 μm kapilára o celkové délce 50 cm. Jako BGE byl použit $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, jehož pH bylo upraveno na 10,00. Kapiláry o větších vnitřních průměrech (50 μm a více) jsou při použití bezkontaktní vodivostní detekce nevhodné, protože samotná vodivost pracovního elektrolytu je dostatečná na to, aby vysytila detektor. $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ kromě své vysoké elektrické vodivosti tvoří se studovanými analyty komplexy. V kapiláře o tomto průměru byla proto použita pouze UV detekce. První měření bylo provedeno se vzorkem o koncentraci analytů $500\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$ při separačním napětí 15 kV. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky. Elektroferogram obsahoval pouze dva signály, dimer a trimer se neseperoaly. Tentýž výsledek byl pozorován i se vzorkem o koncentraci analytů $300\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$. Při třetím měření bylo pH pufru zvýšeno na 10,55. Ani v tomto případě nedocházelo k separaci dimeru a trimernu. Při pátém měření bylo sníženo napětí na 12 kV a čas analýzy prodloužen na 15 min. Ani v tomto případě se dimer a trimer neseperoaly.

4.7 Porovnání v 75 μm kapiláře

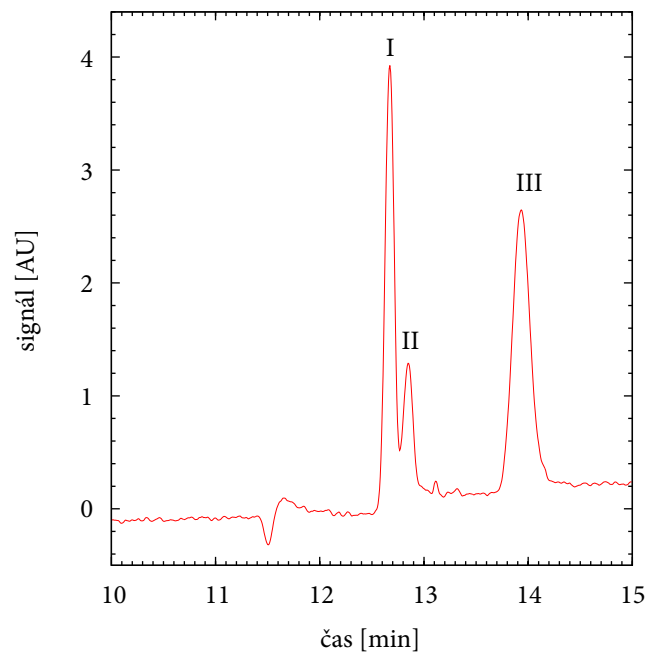
Pro úplné porovnání CCD a UV detekce byla převzata jiná metoda optimalizovaná pro použití UV detekce [6]. Při první analýze byl použit vzorek o koncentraci $300\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$, který byl dávkován hydrodynamicky. Za těchto podmínek nedocházelo k separaci dimeru a trimernu. Vzorek o koncentraci $300\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$ obsahoval 20 % objemu citrátu ($\text{pH} = 4,5$, $c = 200\text{ mmol dm}^{-3}$) a byl dávkován elektrokineticky. V tomto uspořádání docházelo k separaci všech tří analytů. Převzatá metoda používala vzorky obsahující citrát v uvedené koncentraci, pro lepší porovnání s vyvinutou metodou byly měřeny vzorky s citrátem i bez citrátu.

Pro další měření byl připraven nový roztok $25\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, jehož pH bylo upraveno NaOH na hodnotu 10,1. Použitý vzorek byl o koncentraci $300\text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$ a neobsahoval citrát. Vzorek byl dávkován elektrokineticky. I za těchto podmínek docházelo k separaci všech tří analytů.

Pro porovnání bylo měření zopakováno se vzorkem, jehož matrici tvořil 40 mmol dm^{-3} roztok citrátu. Zásobní roztok citrátu měl koncentraci 200 mmol dm^{-3} a pH 4,5. Citrát neměl vliv na účinnost separace, pozitivně však ovlivnil odezvu detektoru; plocha pík analytů byla zhruba dvojnásobná oproti vzorku bez citrátu. Toto měření bylo zopakováno za stejných podmínek ale s použitím hydrodynamického dávkování ($p = 55\text{ mbar}$, $t = 10\text{ s}$). V tomto případě se dimer a trimer neseperoaly.

Další měření bylo provedeno s pufrům o pH 10,5, což mělo příznivý vliv na separaci analytů. Nakonec byla provedena série měření s pěti vzorky pro porovnání vlivu citrátu na účinnost separace a citlivost. Za op-

timálních podmínek pro obě metody byly porovnány meze detekce a stanovitelnosti obou metod. Optimální podmínky pro UV detekci v 75 μ m byly při pH pracovního elektrolytu 10,5, vzorku v matrici 40mmol dm⁻³ roztoku citrátu a elektrokinetickém dávkování.



I - Trimer, II - Dimer, III - Monomer

Obrázek 8: Vzorek o koncentraci 200 μ mol dm⁻³ v matrici 40mmol dm⁻³ citrátu, UV detekce

Tabulka 5: Meze detekce a stanovitelnosti obou metod

h - výška píku, c - koncentrace, ze které byla odečtena výška píku a šum základní linie, N - počet hodnot, x_{bl} - průměrná hodnota signálu základní linie, μ_i - i -tá hodnota signálu základní linie

UV		
	LOD [$\mu\text{mol dm}^{-3}$]	LOQ [$\mu\text{mol dm}^{-3}$]
Monomer	3	10
Dimer	7	21
Trimer	4	13
CCD		
	LOD [$\mu\text{mol dm}^{-3}$]	LOQ [$\mu\text{mol dm}^{-3}$]
Monomer	15	45
Dimer	34	102
Trimer	21	63

Rovnice 7: Vztah pro poměr signál-šum [16]

$$SNR = \frac{\text{Signál(výška píku)}}{\text{Šum(směrodatná odchylka zákl. linie)}} = \frac{h}{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=0}^N (x_{bl} - \mu_i)}}$$

Rovnice 8: Vztah pro výpočet meze detekce

$$LOD = c \cdot \frac{3,3}{SNR}$$

Rovnice 9: Vztah pro výpočet meze stanovitelnosti

$$LOQ = c \cdot \frac{10}{SNR}$$

5 Závěr

V rámci této práce byla vyvinuta a optimalizována metoda pro separaci a detekci N-acetylglukosaminu a jeho dimeru a trimeru metodou kapilární zónové elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí. Tato metoda byla porovnána s alternativní metodou pro stanovení studovaných analytů, která využívá UV detekci. Bylo zjištěno, že studované analyty je možné účinně separovat a detekovat bezkontaktní vodivostní detekcí, je-li použita tenká křemenná kapilára o vnitřním průměru 20 μm a hydroxid sodný jako pracovní elektrolyt. Za optimálních podmínek se všechny tři analyty účinně separují a je možné je detekovat až do koncentrace 34 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. Vzhledem k dobré separaci všech tří analytů lze předpokládat, že by touto metodou bylo možné detekovat i další oligomery N-acetylglukosaminu. Zásadním nedostatkem metody je její nízká robustnost a nízká opakovatelnost. Vysoké pH pracovního elektrolytu způsobuje rychlou degradaci vnitřního povrchu kapiláry a pro zachování funkčnosti metody je nutné kapiláru pravidelně měnit. Aby metoda fungovala spolehlivě, je nutné kontrolovat pH pracovního elektrolytu. Z těchto důvodů je také obtížné sestavit pro metodu spolehlivou kalibraci.

Metoda využívající UV detekci používá kapiláru o vyšším průměru, při použití kapiláry o vnitřním průměru 20 μm je optická dráha tak krátká, že analyty není možné UV detekcí stanovit. Pokud by bylo nutné stanovovat studované analyty v tenké kapiláře, byla by metoda využívající CCD detekci výrazně vhodnější. Dalším nedostatkem metody využívající UV detekci je nedostatečná separace trimeru a dimeru; použití této metody s delšími oligomery by tedy mohlo být problematické. Jednoznačnou výhodou metody využívající UV detekci je její vyšší robustnost a nižší meze detekce a stanovitelnosti.

6 Použité zdroje

- [1] Karel Štulík a kol. *Analytické separační metody*. Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, 2004. ISBN: 80-246-0852-9.
- [2] AJ Zemann et al. „Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis“. English. In: *ANALYTICAL CHEMISTRY* 70.3 (únor 1998), s. 563–567. ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac9707592.
- [3] JAF da Silva a CL do Lago. „An oscillometric detector for capillary electrophoresis“. English. In: *ANALYTICAL CHEMISTRY* 70.20 (15. říjen 1998), s. 4339–4343. ISSN: 0003-2700.
- [4] JGA Brito-Neto et al. „Understanding capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary and microchip electrophoresis. Part 1. Fundamentals“. English. In: *ELECTROANALYSIS* 17.13 (červenec 2005), s. 1198–1206. ISSN: 1040-0397. DOI: {10.1002/elan.200503237}.
- [5] <http://en.wikipedia.org/wiki/N-Acetylglucosamine>. Květen 2013. URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/N-Acetylglucosamine>.
- [6] Tomas Krizek et al. „Offline and online capillary electrophoresis enzyme assays of beta-N-acetylhexosaminidase“. English. In: *ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY* 405.8 (březen 2013), s. 2425–2434. ISSN: 1618-2642. DOI: 10.1007/s00216-012-6607-1.
- [7] Blanka Vochyánová et al. „Rapid determinations of saccharides in high-energy drinks by short-capillary electrophoresis with contactless conductivity detection“. English. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404.5 (2012), s. 1549–1554. ISSN: 1618-2642. DOI: 10.1007/s00216-012-6242-x. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-012-6242-x>.
- [8] Petr Tuma et al. „Rapid monitoring of mono- and disaccharides in drinks, foodstuffs and foodstuff additives by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection“. English. In: *ANALYTICA CHIMICA ACTA* 698.1-2 (18. červenec 2011), s. 1–5. ISSN: 0003-2670. DOI: 10.1016/j.aca.2011.04.055.
- [9] AZ Carvalho, JAF da Silva a CL do Lago. „Determination of mono- and disaccharides by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection“. English. In: *ELECTROPHORESIS* 24.12-13 (červen 2003), s. 2138–2143. ISSN: 0173-0835. DOI: {10.1002/elps.200305408}.
- [10] Lucas Blanes et al. „Direct detection of underivatized chitoooligosaccharides produced through chitinase action using capillary zone electrophoresis“. In: *Analytical Biochemistry* 373.1 (2008), s. 99–103. ISSN: 0003-2697. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2007.08.042>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269707006999>.
- [11] S Cortacero-Ramirez et al. „Analysis of carbohydrates in beverages by capillary electrophoresis with precolumn derivatization and UV detection“. English. In: *FOOD CHEMISTRY* 87.3 (září 2004), s. 471–476. ISSN: 0308-8146. DOI: {10.1016/j.foodchem.2004.01.030}.
- [12] B Fontaniella et al. „Identification of xanthans isolated from sugarcane juices obtained from scalded plants infected by *Xanthomonas albilineans*“. English. In: *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B-ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES* 770.1-2 (25. duben 2002). 2nd International Symposium on Separations in the Biosciences, PRAGUE, CZECH REPUBLIC, SEP 17-20, 2001, s. 275–281. ISSN: 1570-0232. DOI: {10.1016/S1570-0232(01)00579-7}.
- [13] Stella Rovio, Jari Yli-Kauhaluoma a Heli Siren. „Determination of neutral carbohydrates by CZE with direct UV detection“. English. In: *ELECTROPHORESIS* 28.17, SI (srpen 2007), s. 3129–3135. ISSN: 0173-0835. DOI: {10.1002/elps.200600783}.

- [14] Toshiaki Hattori, Nobuhiro Anraku a Ryo Kato. „Capillary electrophoresis of chitooligosaccharides in acidic solution: Simple determination using a quaternary-ammonium-modified column and indirect photometric detection with Crystal Violet“. English. In: *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B-ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES* 878.3-4 (1. únor 2010), s. 477–480. ISSN: 1570-0232. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.11.042.
- [15] Isabella Rustighi et al. „Analysis of N-acetylaminosugars by CE: A comparative derivatization study“. English. In: *ELECTROPHORESIS* 30.15 (srpen 2009), s. 2632–2639. ISSN: 0173-0835. DOI: {10.1002/elps.200800791}.
- [16] *Definition of S/N Ratio*. Květen 2014. URL: http://www.shimadzu.com/an/definition_sn_ratio.html.